



Vektorvakcinákkal a legsúlyosabb vírusos baromfibetegségek ellen, különös tekintettel a baromfipestisre

Dr. Péntzes Zoltán
Biológiai Kutatás-fejlesztés igazgató
Ceva Phylaxia Zrt., Budapest





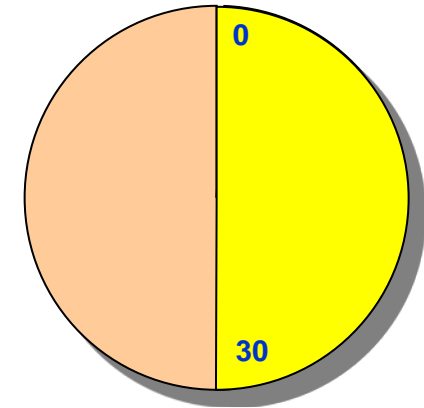




**A BAROMFIPESTIS ÉS A
MADÁRINFLUENZA (HPAI)
A LEGPUSZTÍTÓBB
VÍRUSOS
BAROMFIBETEGSÉGEK**

• Madárinfluenza (avian influenza, AI) és baromfipestis

- protektív antigének és vírusvektor
- Madárinfluenza vektorvakcina (rHVT AI)
 - a fejlesztés főbb lépései
 - hatékonyság vizsgálat
- Baromfipestis vektorvakcina (rHVT ND)
 - néhány jellemző tulajdonság



A legpusztítóbb vírusos baromfibetegségek

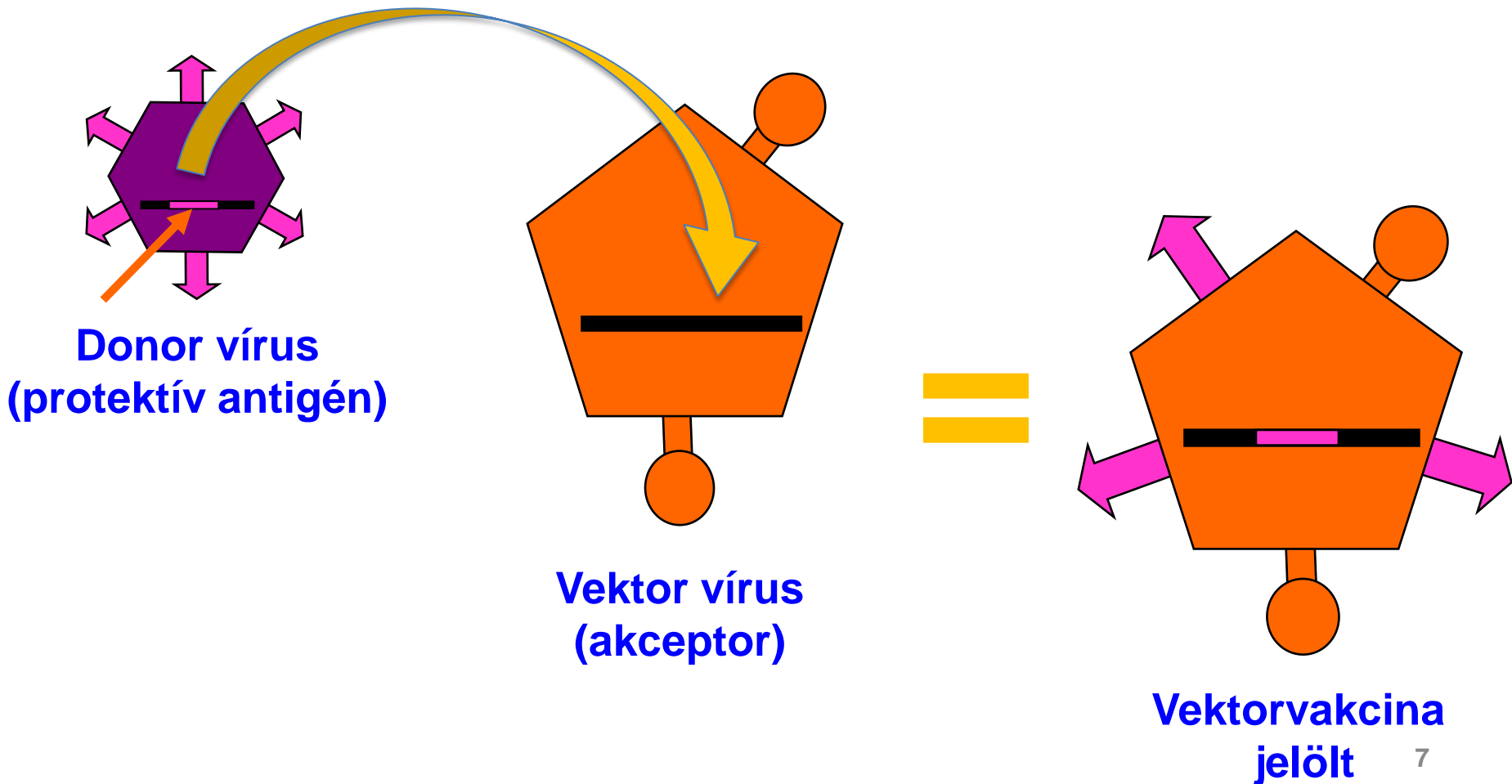


A vektorvakcina fejlesztés alapvető elemei...

A legpusztítóbb vírusos baromfibetegségek



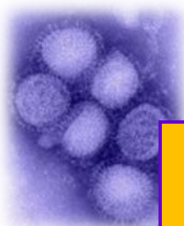
A vektorvakcina fejlesztés alapvető elemei



A legpusztítóbb vírusos baromfibetegségek



Madárinfluenza (AIV) & Baromfipestis (NDV)

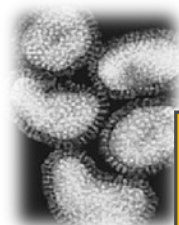
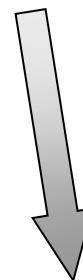


Neuraminidáz (N)

+

Haemagglutinin (HA)

A HA fehérje proteázok hatására kettéhasad és aktiválódik.
HA = protektív antigén

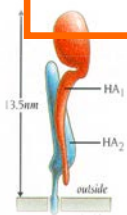


Haemagglutinin
neuraminidáz (HN)

+

Fúziós (F)

Az F fehérje proteázok hatására kettéhasad és aktiválódik.
F = protektív antigén

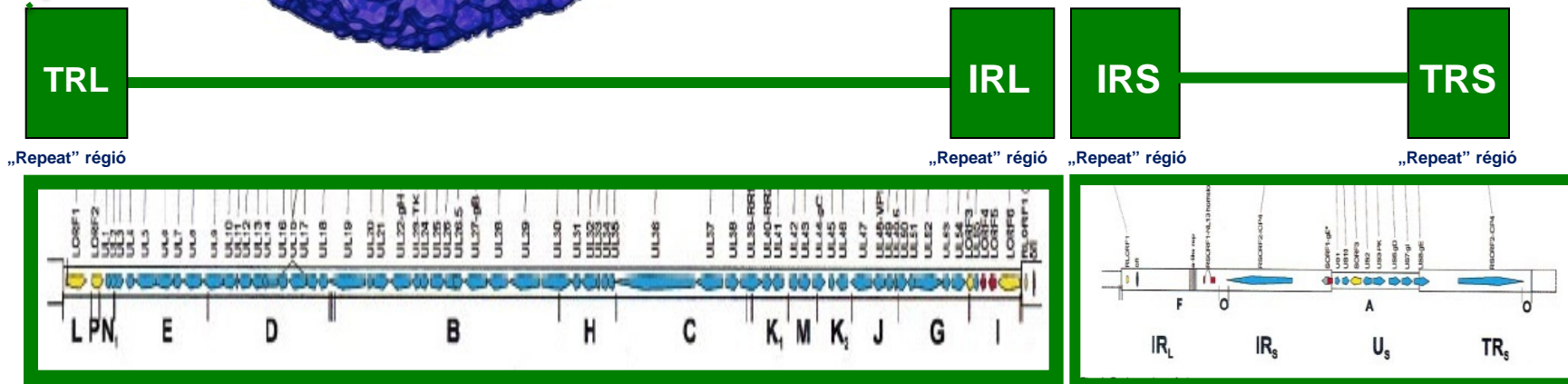
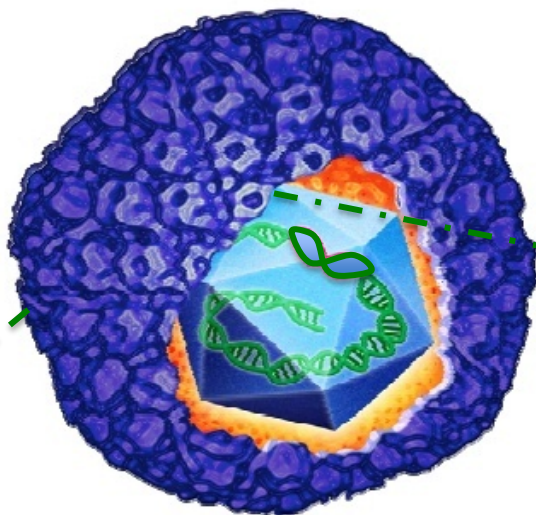


A pulykaherpesz vírus (HVT), mint vektor



Több szempontból ideális vektor

- Nem patogén
- Nem terjed
- Nagy méretű genom
- Genetikailag stabil



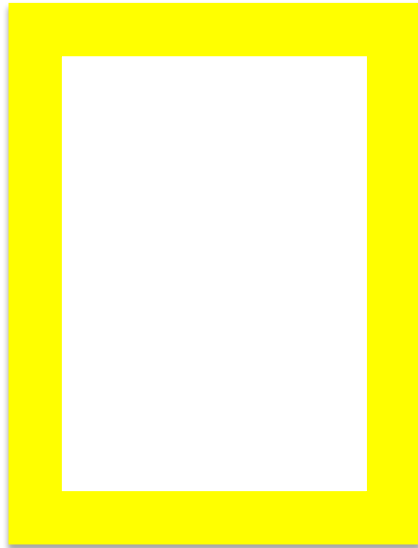
„Unique Long” régió

„Unique Short” régió

A pulykaherpesz vírus (HVT) alapú vektorvakcinák



Példa. Madárinfluenza vektorvakcina



rHVT AI

Hogyan készült?

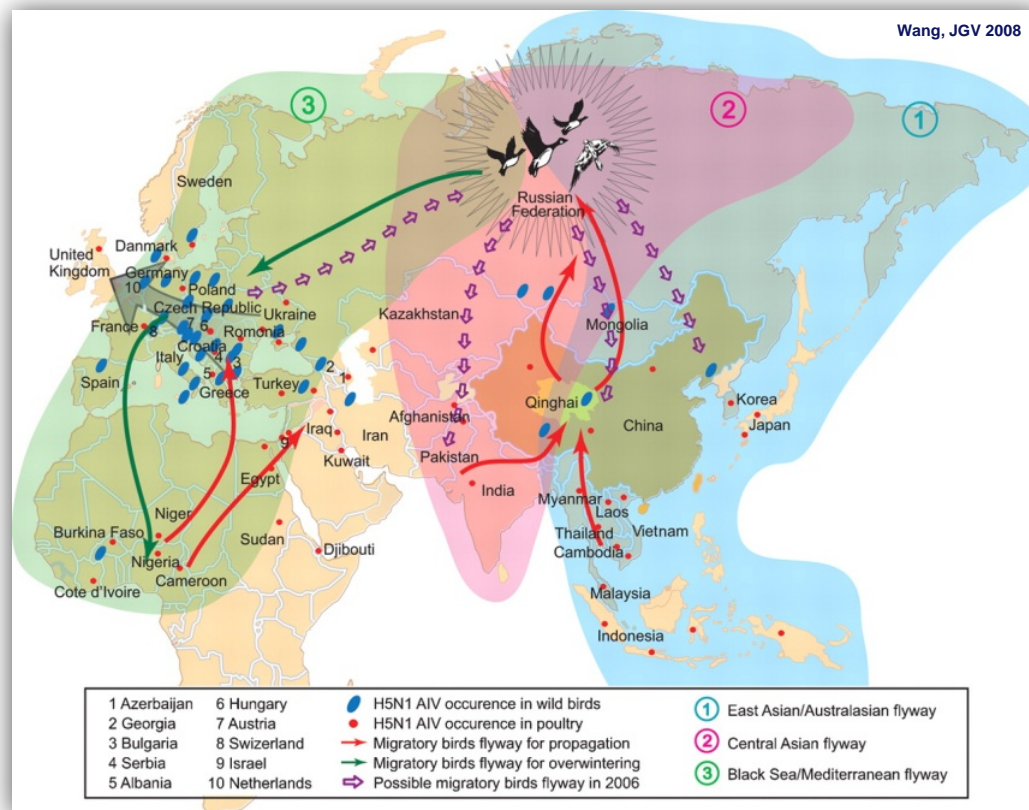
rHVT AI vektorvakcina fejlesztése nagy patogenitású H5 AI vírus ellen



2006 – Európai H5N1 madárinfluenza járvány

• Országos Állategészségügyi Intézet

- 2006. H5N1 AI vírus izolálása
- bütykös hattyú, #4999



rHVT AI vektorvakcina fejlesztése nagy patogenitású H5 AI vírus ellen



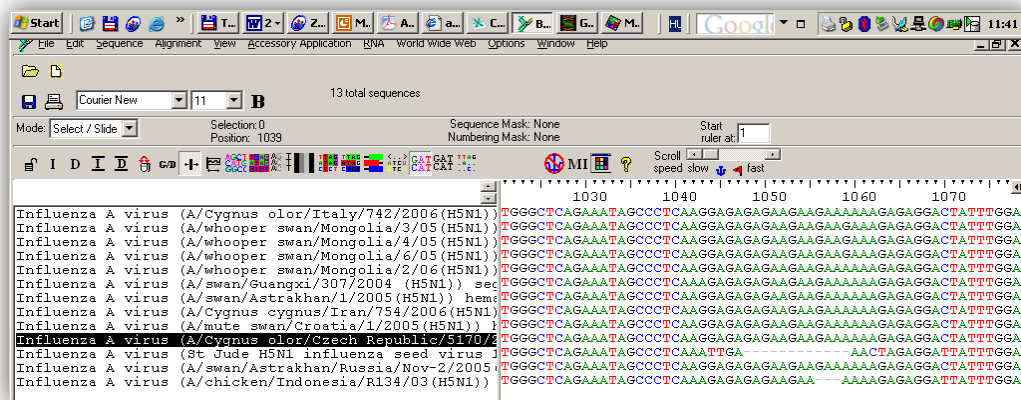
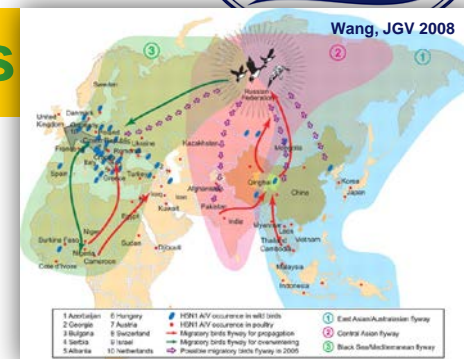
2006 – H5 gén elemzése, DNS klón készítés

- Országos Állategészségügyi Intézet

- 2006. H5N1 AI vírus izolálása
- bütykös hattyú, #4999

- Ceva Phylaxia & MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet

- H5 gén izolálása, elemzése,
- H5 gén módosítása a reverz genetika eszközeivel



rHVT AI vektorvakcina fejlesztése nagy patogenitású H5 AI vírus ellen



2006 – előkészítés rHVT vektorhoz

- Országos Állategészségügyi Intézet

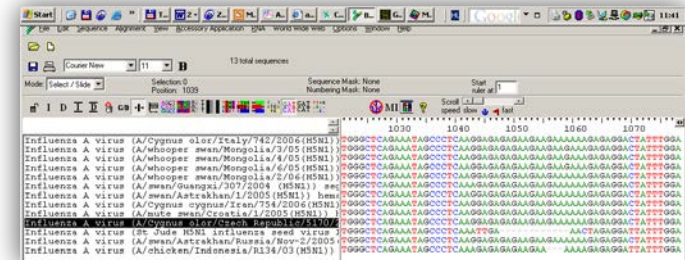
- 2006. H5N1 AI vírus izolálása
- bütykös hattyú, #4999

- Ceva Phylaxia & MTA Állatorvostudományi Kutatóintézet

- H5 gén izolálása, elemzése,
- H5 gén módosítása a reverz genetika eszközeivel

- Ceva Phylaxia

- előkészítés rHVT vektorhoz
- dokumentáció
- export, Ceva Biomune, USA



2006. 10. 26.

A/swan/Hungary/4999/2006 HA gene, mod from B Lomniczi lab, E Somogyi)

PCR done with KOD polymerase. Cloned in

Plasmid name: pTopo-H
CEVA plasmid no.: p562

BamHI 1.
TGACGGATCCATGGAGAAAATAGTGCTTC
TTGGTTACCATGCAAACAACCTCGACAAGAC
CGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACAC

rHVT AI vektorvakcina fejlesztése nagy patogenitású H5 AI vírus ellen

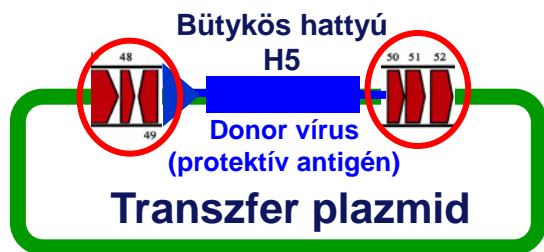


2007 – rHVT vektor technológia

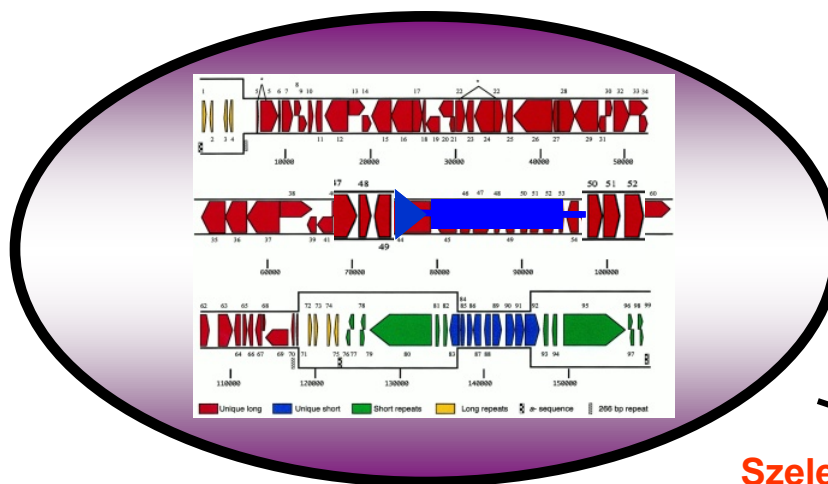
• Ceva Biomune (USA) & Ceva Phylaxia

• rHVT AI vakcinajelöltek előállítás

- beillesztési hely, promóterek stb.



CEF
transzfekeció



Szelekeció

Rekombináns HVT

Vektorvakcina
jelölt



H5 termelődés
kimutatása

rHVT AI vektorvakcina fejlesztése nagy patogenitású H5 AI vírus ellen



2008-2015 – rHVT AI hatékonyság vizsgálata

- Milyen hatékony a vakcina?
- Milyen széles a védelem spektruma?
 - Homológ és heterológ nagy patogenitású H5N1, H5N2 és H5N8 AI vírus ráfertőzések szervezése

rHVT AI* – a védelem széles spektrumú nagy patogenitású H5 AI vírusokkal szemben (2008-2015)

Ráfertőzés helye		Vakcinázás			Ráfertőzés					Védelem				
Intézet	Ország	Baromfi típus	Maternális ea.		H5AIV			Fertőzés módja	Kor (hét)	Klinikai védettség		% Oro-pharyngealis ürítés		
			HVT	AIV	Típus	Törzs	Klád			Vacc.	Ctr.	Mikor	Vacc.	Kont.
U. Maryland	USA	SPF tojó	Nem	Nem	H5N1	A/CK/Viet Nam/1203/2004	1	IN	4	85%	0%	2 dpc	30%	100%
Coda-Cerva	Belgium	Broiler	Igen	Nem	H5N1	A/Duck/Hungary/11804/2006	2.2	IN	2	90%	0%	2 dpc	20%	38%
Coda-Cerva	Belgium	Broiler	Igen	Igen (H5N2)	H5N1	A/Duck/Hungary/11804/2006	2.2	IN	2	100%	20%	2 dpc	0%	60%
Coda-Cerva	Belgium	Broiler	Igen	Igen(H5N2)	H5N1	A/Duck/Hungary/11804/2006	2.2	IN	3	90%	0%	2 dpc	0%	80%
Coda-Cerva	Belgium	SPF tojó	Nem	Nem	H5N1	A/CK/Egypt/1709-1 VIR08/2007	2.2.1	ON	3	100%	0%	3 dpc	80%	100%
Coda-Cerva	Belgium	SPF tojó	Nem	Nem	H5N1	A/CK/Egypt/1709-6/2008	2.2.1	ON	3	100%	0%	3 dpc	100%	100%
Coda-Cerva	Belgium	Broiler	Igen	Nem	H5N1	A/CK/Egypt/1709-6/2008	2.2.1	ON	4	90%	0%	2 dpc	10%	100%
Coda-Cerva	Belgium	Broiler	Igen	Igen(H5N1)	H5N1	A/CK/Egypt/1709-6/2008	2.2.1	ON	4	100%	0%	2 dpc	10%	90%
Coda-Cerva	Belgium	Broiler	Igen	Igen(H5N1)	H5N1	A/CK/Egypt/1709-1 VIR08/2007	2.2.1	ON	4	90%	0%	2 dpc	100%	100%
Coda-Cerva	Belgium	Broiler	Igen	Igen(H5N1)	H5N1	A/CK/Egypt/1709-6/2008	2.2.1	ON	4	70%	0%	2 dpc	90%	100%
Bogor Agri. U.	Indonézia	Broiler	Igen	Igen(H5N1)	H5N1	A/CK/West Java Subang/29/2007	2.1.3	ON	4	80%	0%	2 dpc	60-80%	100%
Bogor Agri. U.	Indonézia	Broiler	Igen	Igen(H5N1)	H5N1	A/CK/Puwakarta-Cilingga/142/2010	2.1.3	ON	4	95%	0%	2 dpc	60-80%	100%
SEPRL	USA	SPF tojó	Nem	Nem	H5N1	A/Whooper Swan/Mongolia/3/2005	2.2	IN	6	100%	0%	2 dpc	13%	100%
SEPRL	USA	SPF broiler	Nem	Nem	H5N1	A/CK/West Java Subang/29/2007	2.1.3	IN	4	80%	0%	NT	NT	NT
SEPRL	USA	SPF tojó	Nem	Nem	H5N2	A/CK/Queretaro/14588/1995	-	IN	4	95%	0%	NT	NT	NT
Coda-Cerva	Belgium	SPF tojó	Nem	Nem	H5N1	A/CK/Egypt/1709-6/2008	2.2.1	ON	4	100%	0%	2 dpc	100%	100%
Coda-Cerva	Belgium	SPF tojó	Nem	Nem	H5N1	A/CK/Egypt/1709-6/2008	2.2.1	ON	8	100%	0%	2 dpc	100%	100%
NLQP	Egyiptom	Broiler	Igen	Igen (H5N1)	H5N1	A/CK/Egypt/1709-6/2008	2.2.1	IN	4	93%	0%	2 dpc	100%	100%
NLQP	Egyiptom	Broiler	Igen	Igen(H5N1)	H5N1	A/CK/Egypt-63/2010 "variant"	2.2.1	IN	5	80%	0%	2 dpc	100%	100%
Coda-Cerva	Belgium	SPF tojó	Nem	Nem	H5N8	A/CK/Germany/2014	2.3.4.4	ON	4	100%	0%	NT	NT	NT
IZSVe	Olaszo.	SPF tojó	Nem	Nem	H5N1	A/CK/Bangladesh/11RS1 984-33/2011	2.3.2.1	ON	4	100%	0%	2 dpc	10%	All dead
NLQP	Egyiptom	Tojó	Igen	Igen(H5N1)	H5N1	A/CK/Egypt/128s/2012	2.2.1	ON	19	73%	0%	3 dpc	0%	100%
NLQP	Egyiptom	Tojó	Igen	Igen(H5N1)	H5N1	A/CK/Egypt/128s/2012	2.2.1	ON	19	60%	0%	3 dpc	7%	100%

dpc: ráfertőzés utáni nap; NT: nem vizsgált

* rHVT AI (Vectormune AI) 2012 –től több országban regisztrálva van.

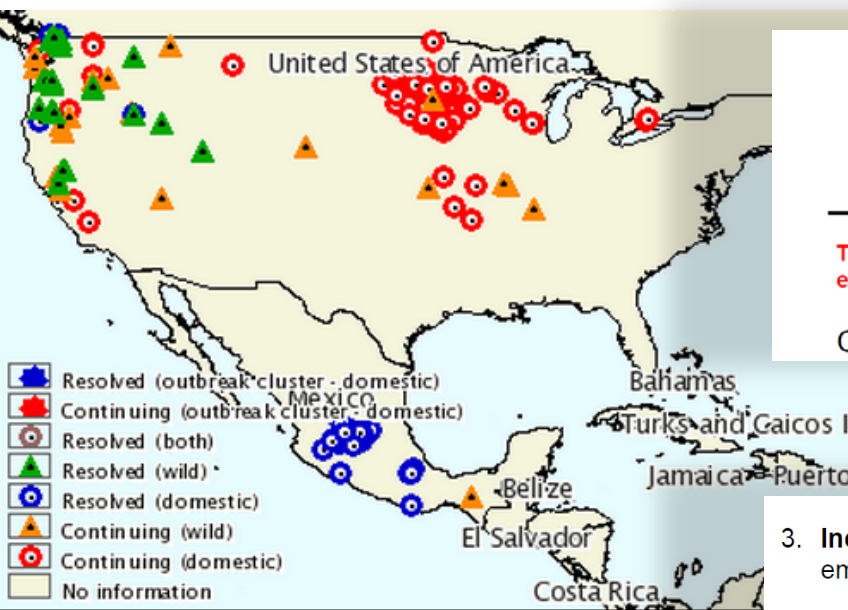
rHVT AI* – a védelem széles spektrumú nagy patogenitású H5 AI vírusokkal szemben (2008-2015)

				Védelem	
Típus	Törzs	Klád	Kor (hét)	Vakc.	Kontroll
H5N1	A/CK/Viet Nam/1203/2004	1	4	85%	0%
H5N1	A/Whooper Swan/Mongolia/3/2005	2.2	6	100%	0%
H5N1	A/Duck/Hungary/11804/2006	2.2	2	100%	20%
H5N1	A/CK/Egypt/1709-1 VIR08/ 2007	2.2.1	3	100%	0%
H5N1	A/CK/Egypt/1709-6/ 2008	2.2.1	3	100%	0%
H5N1	A/CK/Egypt-63/ 2010 "variant"	2.2.1	5	80%	0%
H5N1	A/CK/Egypt/128s/ 2012	2.2.1	19	73%	0%
H5N1	A/CK/West Java Subang/29/ 2007	2.1.3	4	80%	0%
H5N1	A/CK/Puwakarta-Cilingga/142/ 2010	2.1.3	4	95%	0%
H5N1	A/CK/Bangladesh/11RS1 984-33/2011	2.3.2.1	4	100%	0%
H5N2	A/CK/Queretaro/14588/1995	-	4	95%	0%
H5N8	A/CK/Germany/2014	2.3.4.4	4	100%	0%

Nagy patogenitású AI járványkitörés – USA, 2014-2015



H5N8 – 2015 május 18.



http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/countrymapinteractive



United States
Department of
Agriculture

HPAI Outbreak 2014-2015

Policy for HPAI Mitigation

Version 7, May 6, 2015

This information may be revised as the outbreak progresses or with **new scientific or epidemiological information.**

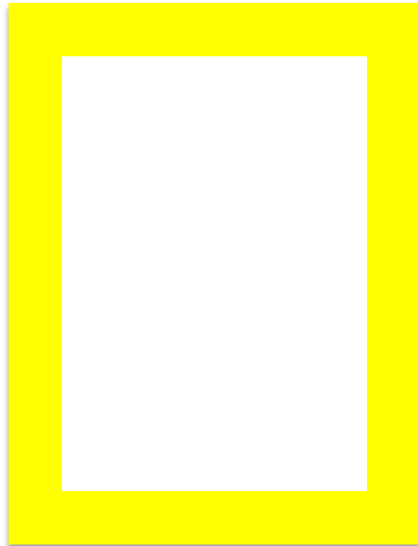
Controlling and Containing the Current Outbreak

- that repopulate prior to APHIS approval and subsequently become re-infected.
3. **Increase the disease resistance of susceptible poultry to the HPAI virus.** Strategic emergency vaccination may be used to increase the disease resistance in poultry.
 - a. APHIS has approved vaccine (CEVA HVT-H5) for emergency use in certain States, per 9 CFR 106.
 - b. Distribution of vaccine will be under the approval of the State Veterinarian of these States, and will be purchased by the producer.
 - c. Turkey replacements will be prioritized initially given the limited quantities of

A pulykaherpesz vírus (HVT) alapú vektorvakcinák



Baromfipestis vektorvakcina



rHVT ND

Vaksinajelöltek előállítása

Immunitás kialakulása

Védelem spektruma

Immunitás tartóssága

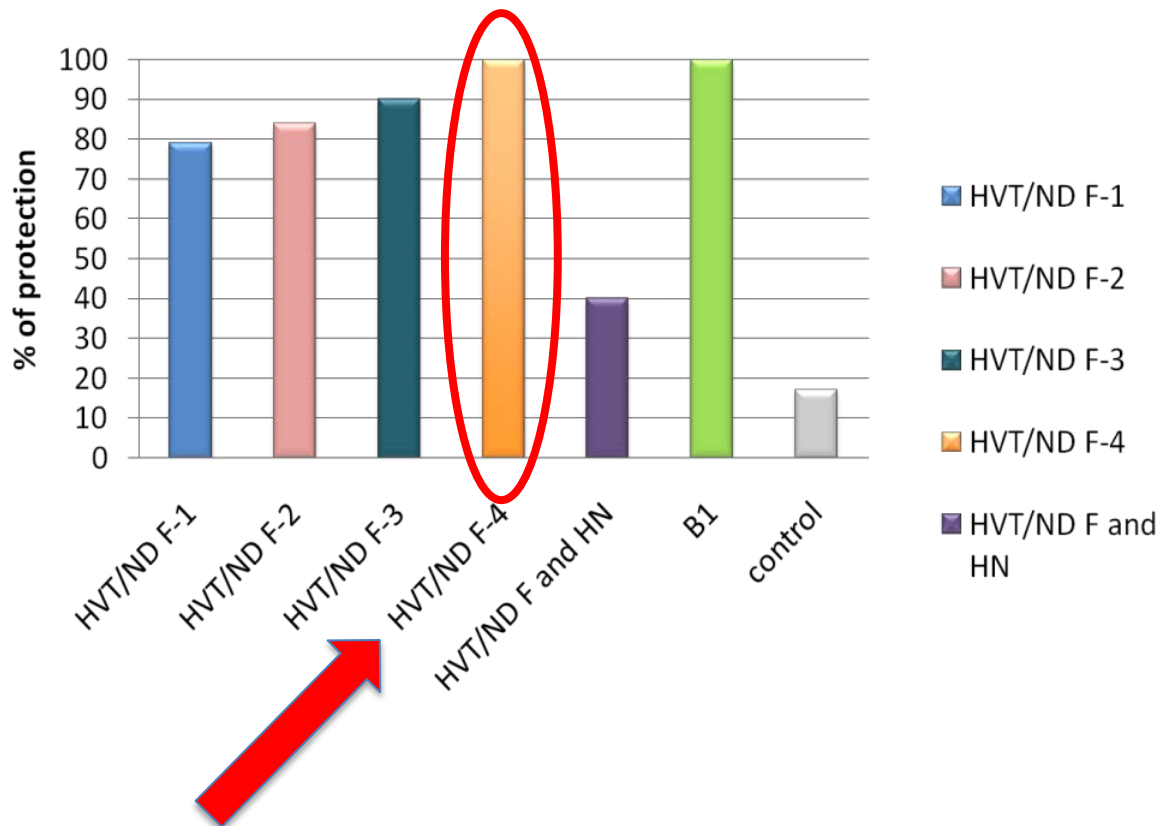
Vírusürítés, szerológia

rHVT ND vektorvakcina fejlesztése



A legjobb rHVT ND vakcinajelölt kiválasztása

- Maternalis ea.-al rendelkező csirke
- rHVT ND vakcinázás, in ovo
- ND B1 vakcinázás 7 napos korban
- Ráfertőzés 44 napos korban
 - Texas GB, 4 log₁₀ ELD₅₀, i.m.
- klinikai védelem értékelése

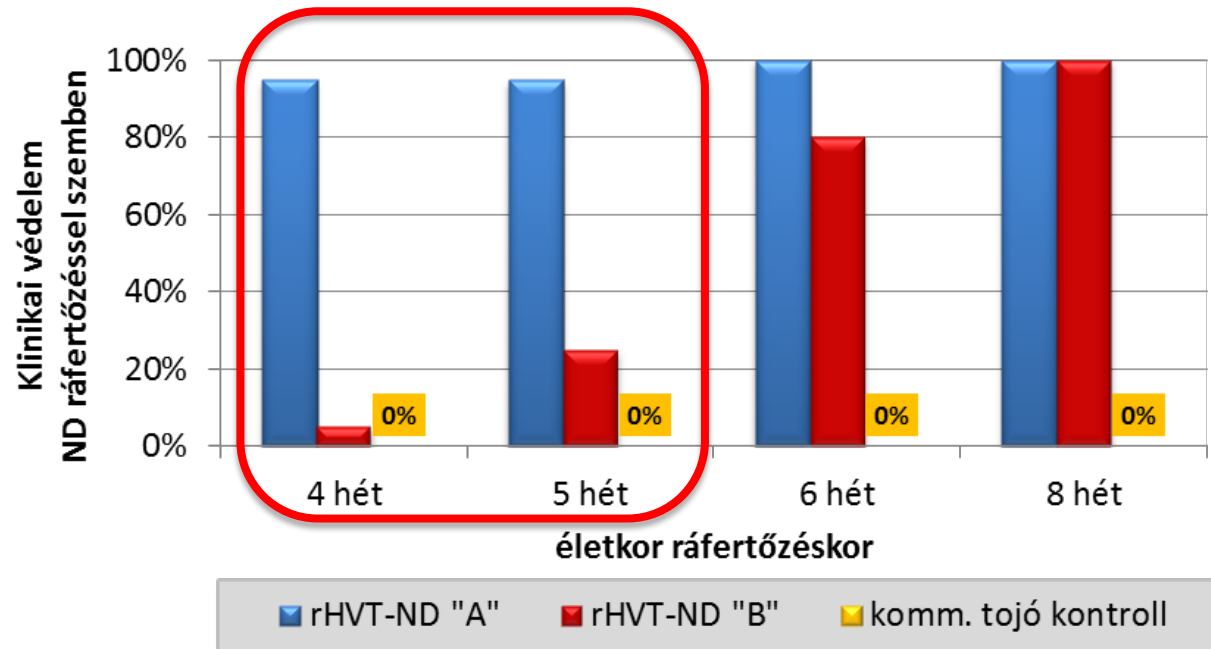


Különbség rHVT ND vakcinák között



Tojóhibrid, immunitás kialakulása

- Maternalis ea.-al rendelkező tojóhibrid csirke
- rHVT ND vakcinázás, s.c.
- Rispens vakcina együttes alkalmazása
- Ráfertőzés 28-35-42-56 napos korban
 - Maláj izolátum, 5 log₁₀ ELD₅₀, i.n.
- Klinikai védelem értékelése



A két vakcinavírus között jelentős különbség van az immunitás kiépülése terén.

Immunitás kialakulás és immunitás tartósság vizsgálata



Broiler csirke

• rHVT ND „A” vakcinázás

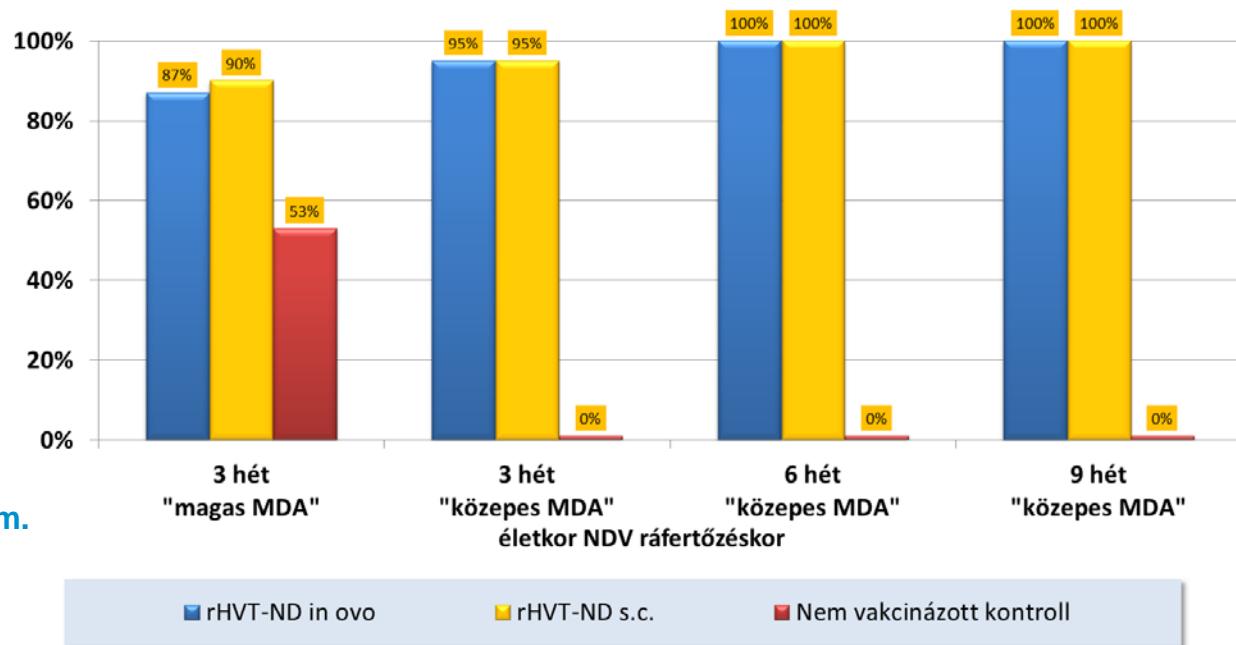
- in ovo
- subcutan

- „magas” HAG titerű állomány
- „közepes” HAG titerű állomány

• Ráfertőzés

- 3, 6, 9 hetes korban
- NDV Herts 33/56, 5 log₁₀ ELD₅₀ i.m.

Klinikai védelem ND ráfertőzés ellen

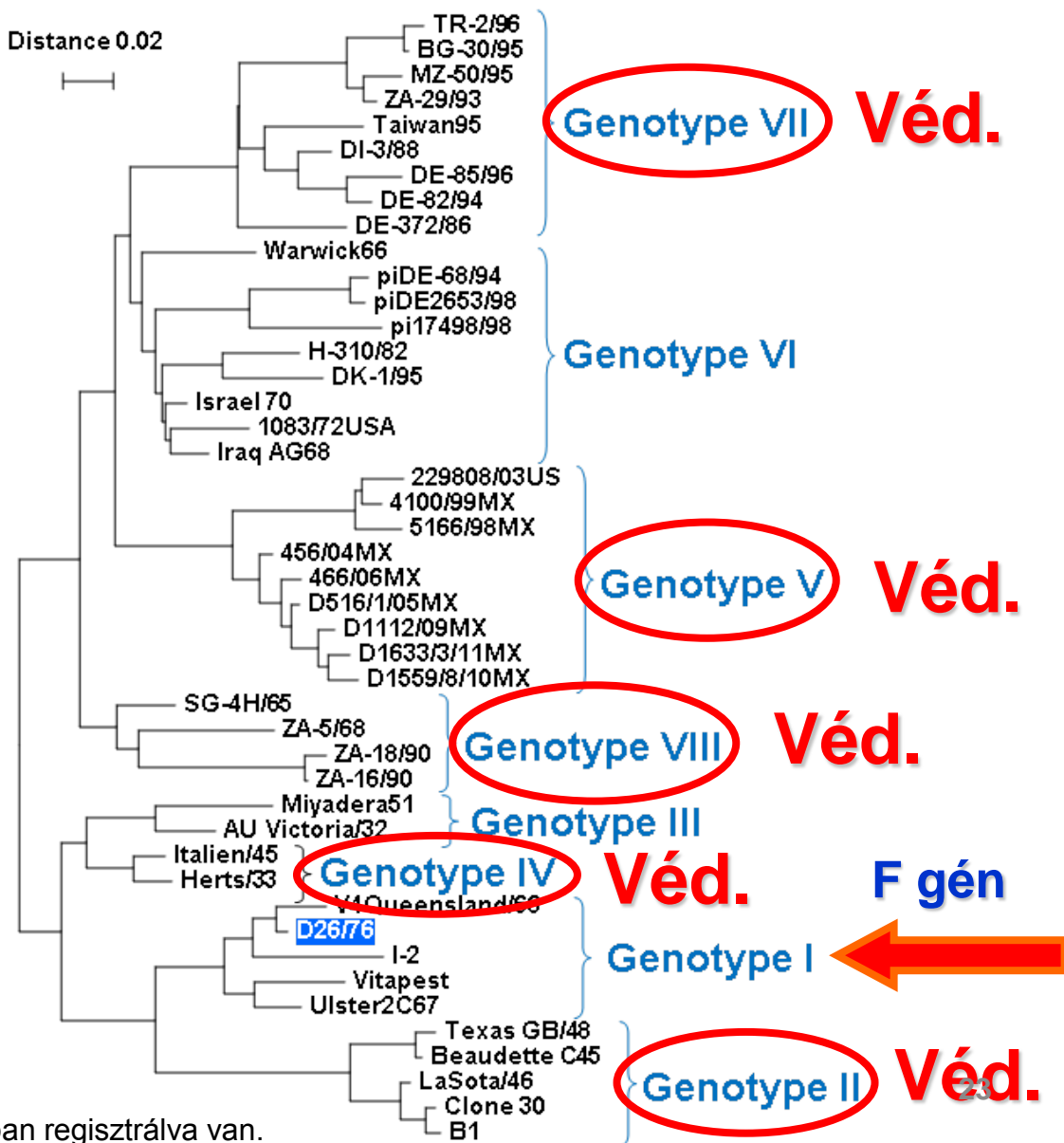


Közel teljes klinikai védelem alakul ki 3 hétre, mely minimum 9 hétig 100%-os szinten marad.

*rHVT ND – a védelem spektruma

Széles spektrum

Véd-e különböző genotípusú NDV törzsek ellen?



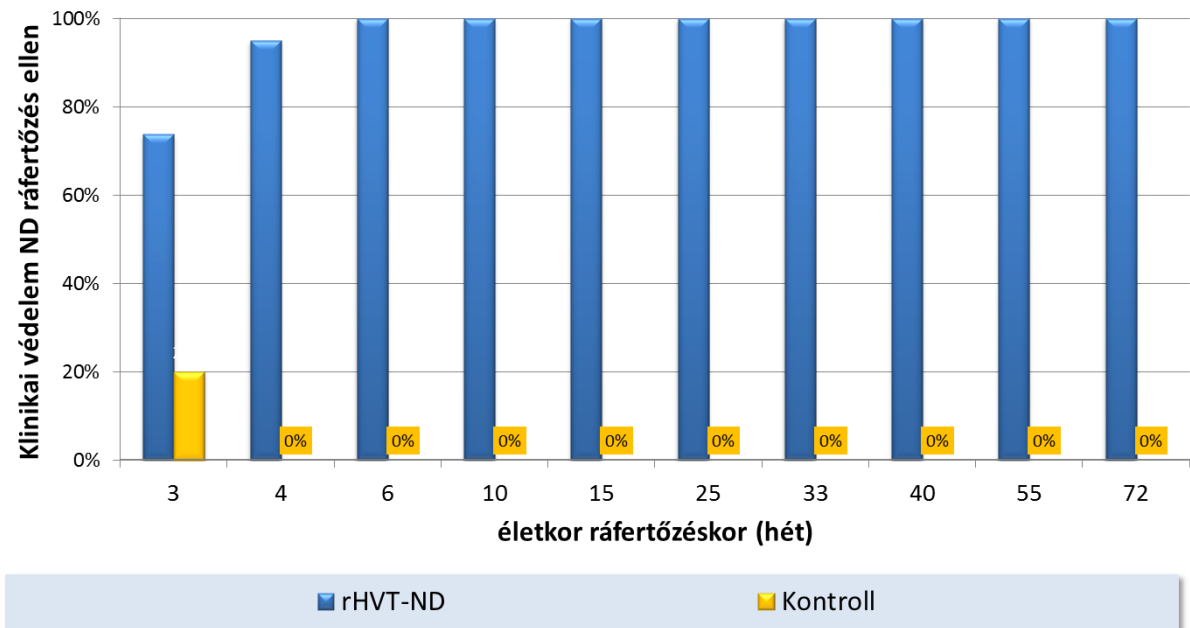
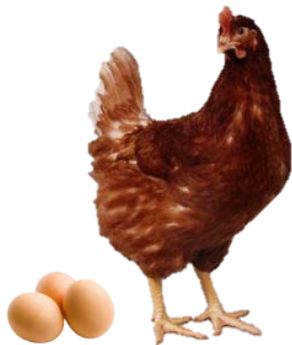
* rHVT ND (Vectormune ND) 2007 –től több országban regisztrálva van.

Immunitás tartósság vizsgálata



Tojóhibrid, klinikai védelem

- Lohmann Brown Lite tojóhibrid
- rHVT ND naposkori subcutan vakcinázás
- Velogén NDV ráfertőzés a 3 - 72. héten (VII genotípus, Malaysia, 2010)
- Klinikai védelem értékelése



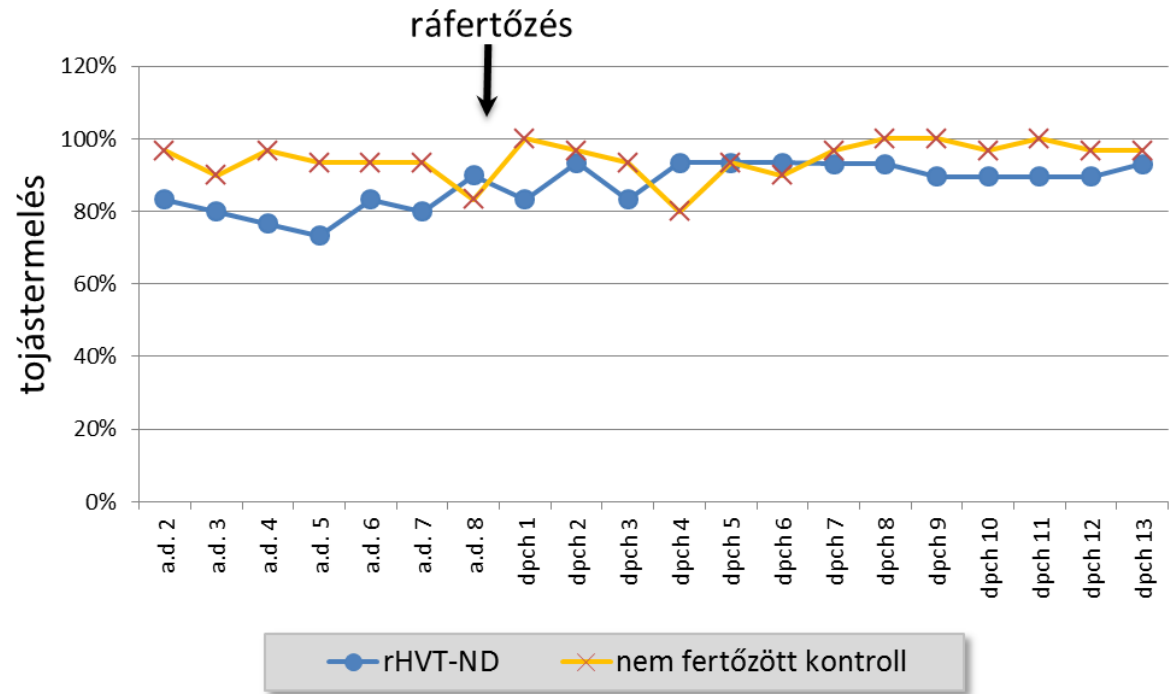
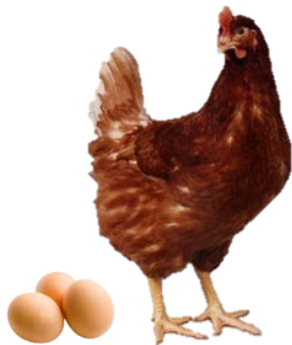
Egyetlen naposkori rHVT ND vakcinázás 100% védettséget biztosít a 72. hétig.

Immunitás tartósság vizsgálata



Tojástermelés csökkenés elleni védelem

- Lohmann Brown Lite tojóhibrid
- rHVT ND naposkori subcutan vakcinázás
- Velogén NDV ráfertőzés a 33. héten (VII genotípus, Malaysia, 2010)
- Klinikai védelem értékelése



Klinikai védelem: 100%
(nem vakcinázott, ráfertőzött kontroll: 0%)

Egyetlen naposkori rHVT ND vakcinázás teljes védelmet nyújt az ND ráfertőzés hatására esetlegesen bekövetkező tojástermelés csökkenés ellen.

Vírusürítés csökkentése



Broiler csirke

• rHVT ND

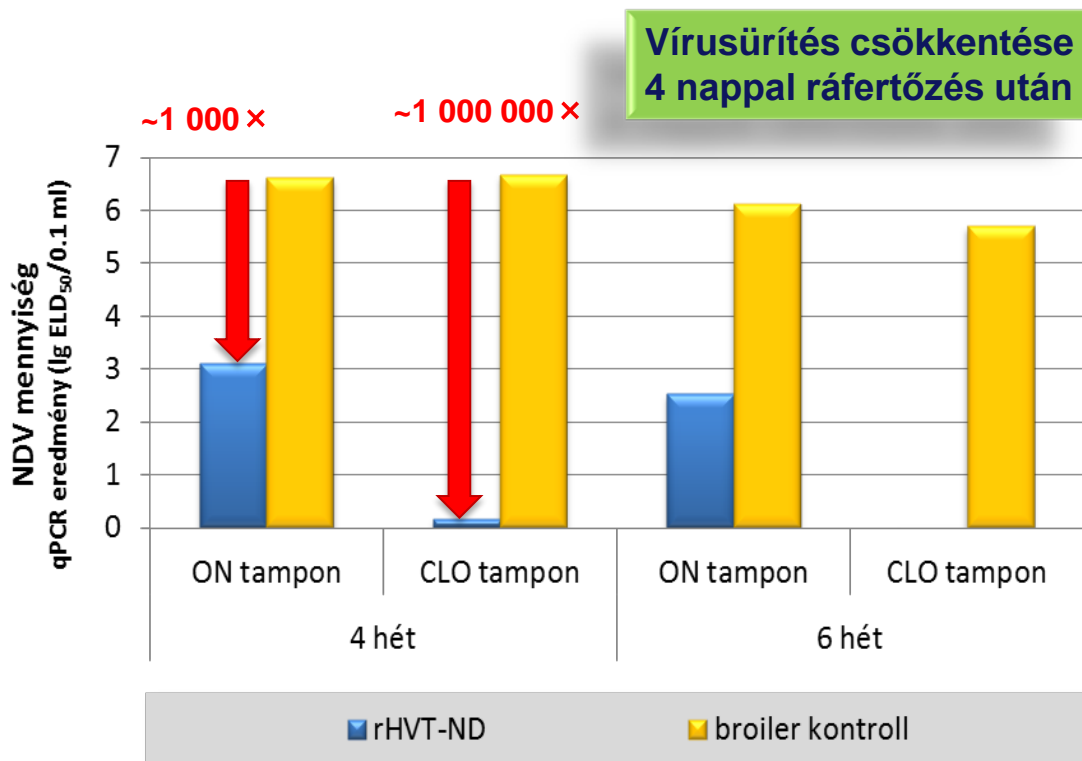
- napos subcutan

• Velogén NDV ráfertőzés

- **4 és 6 hetes** korban
- NDV D1524/1/1,2/MY/10 törzs (G VII)
- 5 log₁₀ ELD₅₀, i.n.

• Vírusürítés vizsgálata

- oro-nasalis- (ON) és
- kloaka (CLO) tampon kvantitatív PCR-el



Az ND vírusürítés ezred – milliomod részére csökkenthető (~ 3-6 log₁₀ csökkentés)

Immunválasz monitorozása. Szerológia



Broiler csirke

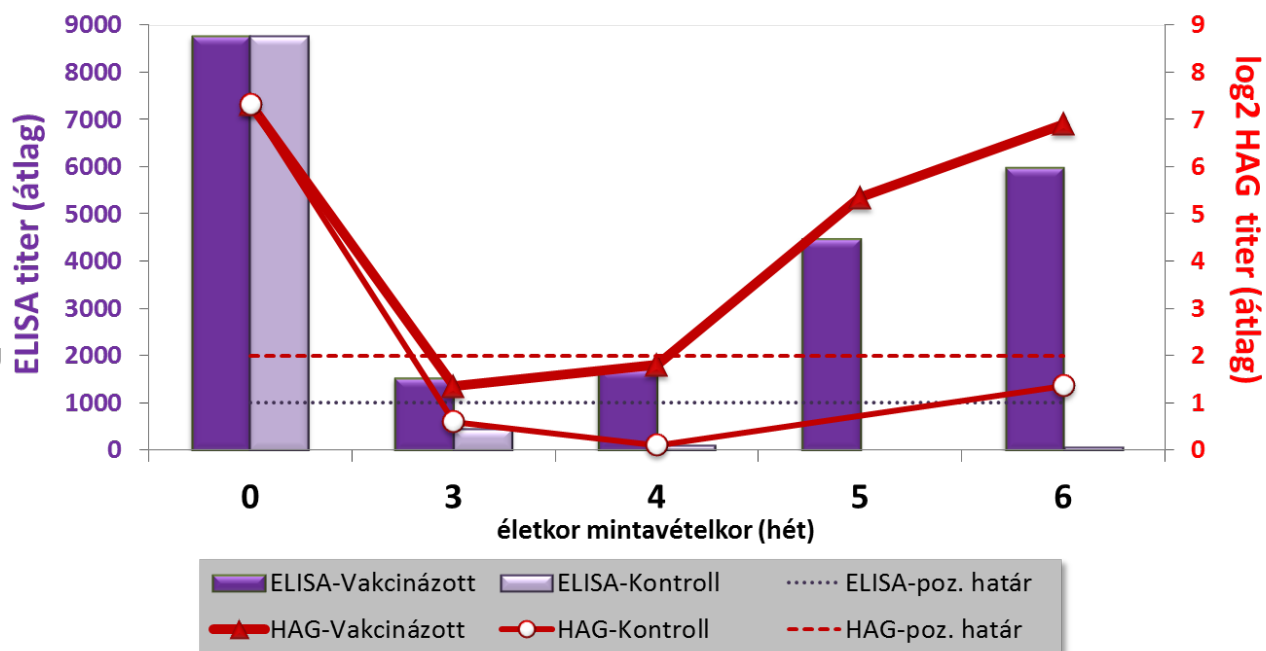
• rHVT ND

- Naposkori vakcinázás

• ELISA

- ID Screen®
Newcastle Disease Indirect
for HVT-NDV vaccine monitoring

• HAG teszt



ELISA és HAG módszerrel is jól mérhető immunválasz alakul ki 5-6 hetes korra.

Vektorvakcinákkal a legsúlyosabb vírusos baromfibetegségek ellen



Összefoglalás

- A HVT alapú vektorvakcinákkal nagyon hatékonyan lehet védekezni a legpusztítóbb vírusos baromfibetegségek ellen.
 - rHVT AI: hazai H5 „alapanyag”, magyar kutatók jelentős hozzájárulásával és Ceva vállalati technológiával kifejlesztésre került egy a H5 típusú nagy patogenitású madárinfluenza elleni *nagyon széles spektrumú* vektorvakcina.
 - rHVT ND: a vakcina kifejlesztése megváltoztathatja a baromfipestis elleni védekezés évtizedes stratégiáját.

**Köszönöm a
figyelmet!**

Köszönetnyilvánítás

Palya Vilmos

Yannick Gardin

Lomniczi Béla

Ceva Phylaxia munkatársak

Ceva Biomune munkatársak

Ceva Japán munkatársak

